

## BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY DOCUMENT**  
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
 COMPLIANCE WITH  
 RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 14 JUL 2000

WIPO PCT

10-030801

EP 00 / 05827

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
 einer Patentanmeldung**

E J K N

**Aktenzeichen:**

199 32 782.3

**Anmeldetag:**

14. Juli 1999

**Anmelder/Inhaber:**

Biotest Pharma GmbH, Dreieich/DE

**Bezeichnung:**

Verfahren zur chromatographischen Fraktionierung  
 von Plasma oder Serum, so erhaltene Präparate  
 und deren Verwendung

**IPC:**

C 07 K, A 61 K

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-  
 lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 15. Juni 2000  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
 Im Auftrag

Brand

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Fraktionierung von Plasma oder Serum, dadurch gekennzeichnet, daß man  
die das Plasma oder Serum enthaltende Ausgangslösung einer hydrophoben  
5 Interaktions-chromatographie unterwirft und unter Anwendung eines stufenweisen  
Salzgradienten wenigstens in eine Immunglobulin- und eine Albumin-haltige Fraktion  
auftrennt.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Ausgangsmaterial ein  
10 Plasma oder ein Serum humanen oder tierischen Ursprungs verwendet wird.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Chromatographie  
mit einem Ammoniumsulfatsalzgradienten erfolgt.
- 15 4. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Chromatographie bei  
hoher Ammoniumsulfatkonzentration beginnt und diese im nächsten Fraktionsschritt  
abgesenkt wird.
5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die hohe  
20 Ammoniumsulfatkonzentration zwischen 0,6 und <1,4 Mol/l und die niedrige  
Ammoniumsulfatkonzentration zwischen 0 und 0,4 Mol/l beträgt.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die hohe  
Ammoniumsulfatpufferkonzentration 0,7 bis 1 Mol/l beträgt und abgesenkt wird auf 0 bis  
0,3 Mol/l.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die  
Ausgangslösung und die Chromatographie-Phase bei Beginn der Trennung auf die  
gewünschte hohe Salzgradientenkonzentration eingestellt wird.  
30
8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das  
Plasma von den Gerinnungsfaktoren des PPSB-Komplexes befreit ist.
9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß als  
35 Ausgangsmaterial ein von Gerinnungsfaktor VIII befreites Plasma eingesetzt wird.

10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß man als Ausgangsmaterial polyvalentes Humanplasma verwendet.
- 5 11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß man als Ausgangsmaterial bezüglich viraler, bakterieller oder gegen zelluläre Antigene gerichtete Antikörper selektiertes Humanplasma verwendet.
- 10 12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß nach der gewonnenen ersten Fraktion mittels Stufengradienten zwei weitere Fraktionen gewonnen werden.
- 15 13. Verfahren gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Auftrennung nach der ersten Fraktion mit einem Ammoniumsulfatpuffer einer Konzentration von 0,4 bis 0,1 Mol/l beginnt und danach abgesenkt wird auf < 0,1 bis 0 Mol/l.
- 20 14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß als hydrophobe Interaktionsphase Phenyl- oder Alkyl-substituierte Phasen auf der Basis von Copolymeren aus Glycidyl-methacrylat und Ethylenglycol-dimethacrylat, Copolymere aus Polystyrol und Divinylbenzol oder mit Dextran oder Polymeren gecoatete Kieselgele verwendet werden.
- 15 15. Verfahren gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß als hydrophobe Interaktionsphase Phenyl-substituierte Copolymere aus Glycidylmethacrylat und Ethylenglycoldimethacrylat verwendet wird.
- 30 16. Verfahren gemäß Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die hohe Ammoniumsulfatpufferkonzentration 0,8 bis 1,0 Mol/l und die abgesenkte Ammoniumsulfatkonzentration 0,3 bis 0 Mol/l beträgt.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die erste Fraktion bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 0,9 Mol/l gewonnen wird und danach ein Stufengradient angewendet wird, wobei die Ammoniumsulfatkonzentration zunächst 0,3 Mol/l beträgt, und sodann auf 0 Mol/l abgesenkt wird.

18. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man die gewonnene erste Fraktion in an sich bekannter Weise aufarbeitet und therapeutisch verwendbares Antithrombin III, Transferrin und/oder Albumin gewinnt.

5 19. Verfahren gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die gewonnene erste Fraktion durch Affinitätschromatographie sowie nachfolgende Anionenaustauscherchromatographie und Virusinaktivierung sowie übliche Filtrations-, Konzentrations- und Sterilisierungsschritte aufgearbeitet wird.

10 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß man die gewonnene zweite Fraktion in an sich bekannter Weise aufarbeitet und therapeutisch einsetzbares Immunglobulin, insbesondere IgG gewinnt.

21. Verfahren gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man die gewonnene zweite Fraktion durch Anionenaustauscherchromatographie, Virusinaktivierung, Oktansäurebehandlung sowie Kationenaustauscherchromatographie und übliche Filtrations-, Sterilisations- und Konzentrierungsschritte zu einem verträglichen Immunglobulin G Präparat aufarbeitet.

20 22. Rezyklisierungsverfahren zur Fraktionierung von Plasma oder Serum gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man das Permeat aus der ersten erhaltenen Fraktion kontinuierlich dem Ammoniumsulfatpuffer-Vorratsbehälter mit der Pufferlösung 1 zuführt, die gewonnene erste Fraktion kontinuierlich sammelt, die zweite Fraktion durch Herstellen eines Mischpuffers aus der Pufferlösung 1 und einer Ammoniumsulfat-freien Pufferlösung 2 oder alleinigen Einsatz des Puffers 2 eluiert und kontinuierlich entfernt.

23. Verfahren gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß man nach der Eluierung der ersten Fraktion die Chromatographiesäule mit einem Stufengradienten behandelt und so eine zweite und dritte Fraktion erhält.

24. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, daß man nach je einem Rezyklisierungskreislauf die Interaktionschromatographiephase mit Natronlauge aus einem Vorratsbehälter 3 behandelt.

- 
25. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 22 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß man die gewonnene erste Fraktion in an sich bekannter Weise aufarbeitet und therapeutisch verwendbares Antithrombin III, Transferrin und/oder Albumin gewinnt.
- 5 26. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 22 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß man die gewonnene zweite Fraktion in an sich bekannter Weise aufarbeitet und therapeutisch verwendbares Immunglobulin, insbesondere IgG, gewinnt.
- 10 27. Immunglobulinpräparat, erhalten nach einem Verfahren gemäß den Ansprüchen 20, 21 oder 26.
28. Antithrombin III Präparat, erhalten gemäß Anspruch 18, 19 oder 25.
29. Verwendung eines Immunglobulinpräparates oder eines Antithrombin III-, Albumin- oder Transferrin-Präparates, erhalten nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 26 zur therapeutischen Anwendung.

5     Unsere Nr. 28 876

Biotest Pharma GmbH  
Landsteinerstraße 5  
63303 Dreieich

10

**Verfahren zur chromatographischen Fraktionierung von Plasma oder Serum, so  
erhaltene Präparate und deren Verwendung**

15     Die Erfindung betrifft das in den Ansprüchen beschriebene Verfahren zur chromatographischen Fraktionierung von Plasma oder Serum, insbesondere Humanplasma/-Serum an einer hydrophoben Interaktionsphase mittels eines stufenweisen Salzgradienten sowie die daraus hergestellten Proteinpräparate und deren Verwendung.

20     Erste Versuche zur industriellen Fraktionierung von Humanplasma wurden schon in den 40iger Jahren durchgeführt. Die hierbei angewandte Methode basiert auf der Fällung von Proteinfractionen mittels Alkohol, wobei durch Variation von pH, Ionenstärke, Temperatur und Alkoholkonzentration in diesen Fraktionen verschiedene Plasmaproteine in angereicherter Form erhalten werden.

25     Von besonderer Bedeutung für die therapeutische Anwendung sind die nach diesem Prozess gewonnenen Fraktionen, die Immunglobuline und Albumin enthalten. Eine Übersicht über o. g. Methoden ist den Übersichtsartikeln (J.E. More, M.J. Harvey, Blood Separation and Plasma Fractionation, Wiley-Liss, New York 1991, 261-306 und P. Kistler, H. Friedli, Methods of  
30     Plasma Protein Fractionation, Academic Press, London, 1980, 3-15) zu entnehmen.

Neben Alkohol werden auch andere Fällreagenzien, wie Ammoniumsulfat und Polyethylenglycol, zur Gewinnung von Plasmafraktionen eingesetzt (A.P. Phillips, K.L. Martin, W.H. Horton, The choice of methods for immunoglobulin IgG purification: Yield and Purity of  
35     Antibody Activity, J. of Immunological Methods, 74 (1984) 385-393, A. Polson et al., The Fractionation of Protein Mixtures by Linear Polymers of High Molecular Weight, Biochem.

Biophys. Acta, 82 (1964) 463-475; P.D. Gorevic et. al., Methods in Enzymology, Vol. 116, 1985, 3-25; DE 2936047C2).

Prinzipiell weisen alle Fällmethoden zur Isolierung von Plasmaproteinen einige Nachteile auf.

- 5 Die zur Fällung eingesetzten Agentien bewirken eine partielle Denaturierung der separierten Proteine. Dies ist an der Bildung von Aggregaten und damit verbundenen Unverträglichkeiten bei der therapeutischen Anwendung zu erkennen. Um aus den so gewonnenen Proteinfraktionen verträgliche Präparate zu erhalten, sind weitere aufwendige Reinigungsschritte notwendig.

10

Ein weiterer Nachteil der Methoden besteht darin, dass Fällungsreaktionen, speziell bei so komplexen Gemischen wie Humanplasma, niemals quantitativ verlaufen. Dies und die zusätzlich notwendigen Reinigungsschritte führen zu beträchtlichen Ausbeuteverlusten.

15 Diese Verfahren stellen somit keine optimale Nutzung des wertvollen Ausgangsmaterials, insbesondere von Humanplasma oder Humanserum dar.

Aus diesem Grunde wurden Versuche unternommen, die Plasmafraktionierung mit schonenderen Methoden und höheren Ausbeuten durchzuführen. Hierzu bieten sich adsorptive Methoden an.

20

Spezielle Eigenschaften der Proteine, wie Ladung, Hydrophobizität, Größe und charakteristische Bindungseigenschaften werden dazu genutzt, um eine Bindung der Proteine an geeignete Liganden zu bewirken.

25 Besonders vorteilhaft ist es, wenn diese Liganden an einen wasserunlöslichen stationären Träger gebunden sind. Die Bindung der Proteine an den substituierten Träger kann im Batch- oder als säulenchromatographisches Verfahren durchgeführt werden, wobei sich die chromatographische Methode als besonders vorteilhaft erweist. Zur chromatographischen Isolierung von Plasmaproteinen wurden Anionen- und Kationenaustauscher, Affinitäts- und hydrophobe Phasen sowie ausschlußchromatographische Materialien eingesetzt.

30

Diese chromatographischen Methoden wurden bisher in erster Linie zur Feinreinigung von gefällten Plasmafraktionen verwendet.

35 Im Folgenden sind einige Beispiele aufgelistet.

In der EP 0447585B1 ist die Isolierung von Immunglobulin G aus Cohn Paste II beschrieben.

EP 0352500B1 beinhaltet die Herstellung von Immunglobulin M aus mit Alkohol präzipitierter Paste III.

5

Transferrin (DE 3733181C1),  $\alpha_1$ -Antitrypsin (EP 0717049A1, US 5,610,285) und Antithrombin III (EP 0844254A2) können mit Hilfe unterschiedlicher chromatographischer Methoden aus Cohn-Paste IV isoliert werden.

10 Cohn-Paste V dient als Ausgangsmaterial für die chromatographische Albumin-Herstellung (EP 0792887A1) sowie zur Aufreinigung von  $\alpha_1$ -saurem Glycoprotein (US 5,739,293).

Ebenso können alkoholhaltige Überstände der Cohn-Fraktionierung als Ausgangsmaterial für eine chromatographische Albumin-Herstellung eingesetzt werden (EP 0402205B1).

15

Eine Kombination von Alkoholfällung und Chromatographie zur Gewinnung von Plasma-proteinen ist in US 5,138,034 beschrieben.

20 Auch die direkte Gewinnung von Immunglobulin G und Albumin aus Humanplasma, ohne vorherige Fällung und Abtrennung eines Präzipitates, mittels Ionenaustauschchromatographie ist in DE 3640513C2 und WO 94/29334 beschrieben.

Eine Übersicht über die Anwendung chromatographischer Methoden zur Gewinnung von Proteinen aus Humanplasma findet sich in: J.M. Curling, Separation of Plasma Proteins, Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden, 1993.

Wie schon oben erwähnt, weisen alle beschriebenen Verfahren entscheidende Nachteile auf. So führen alle über Fällreaktionen gewonnenen Plasmaproteine zu erheblichen Ausbeuteverlusten und erfordern aufwendige zusätzliche Reinigungsschritte, um die therapeutische Anwendung zu ermöglichen. Außerdem ist ein großer technischer Aufwand zur Kühlung der Reaktionsgefäße, Zentrifugen oder Filter notwendig.

30

Die mittels Ionenaustauschchromatographie aus Plasma gewonnenen Produkte erfordern eine aufwendige Vorkonfektionierung des Humanplasmas.



Zur Durchführung der Ionenaustauschchromatographie muß das Plasma auf eine definierte, niedrige Ionenstärke eingestellt werden. Dies kann durch Verdünnen oder durch Umpufferung erreicht werden.

- 5 Hierbei entstehen große Volumina, die im technischen Maßstab die Menge des zu prozessierenden Plasmas limitieren. Darüber hinaus muß durch einen zusätzlichen Schritt vor der Chromatographie das im Humanplasma enthaltene Fibrinogen entfernt werden, um ein Verblocken der Säule zu verhindern.
- 10 S. Coheen et al. beschreiben in J. of Chromatography, 326 (1985), 235-241 ein Verfahren zur Fraktionierung von Humanserum. Dabei wird eine Bio-Gel TSK Phenyl-5PW-Säule mit der Ausgangslösung bestückt und anschließend bei 0°C mittels eines linearen Ammoniumsulfatsalzgradienten in 0,1 M Natriumphosphatpuffer eluiert. Eine solche lineare Eluierung kann nur im analytischen Maßstab vorgenommen werden, da ansonsten bei Auftragen der
- 15 Ausgangslösung und Anwendung der genannten Anfangskonzentration von 1,7 M die Säule verstopfen würde, wenn man im präparativen Maßstab arbeiten würde. Darüberhinaus muß bei 0°C gearbeitet werden, um die Auflösung des Chromatogramms zu verbessern. Eine solche Verfahrensweise ist auf einen Prozess im präparativen Umfang wegen des technischen Aufwands nicht übertragbar.
- 20 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein im technischen Maßstab wirtschaftlich durchführbares Verfahren zur Fraktionierung von Plasma, insbesondere Humanplasma, oder Serum, insbesondere Humanserum, bereitzustellen, das in hohen Ausbeuten native, unmodifizierte Plasmaproteine liefert. Hierbei sollte ein Präzipitieren und Auflösen von
- 25 therapeutisch relevanten Proteinen überwiegend vermieden werden und der Prozess bei Raumtemperatur ablaufen.
- Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß man das Plasma oder Serum, insbesondere humanen Ursprungs, bevorzugt ein von Gerinnungsfaktor VIII und/oder den
- 30 Gerinnungsfaktoren des PPSB-Komplexes befreites Plasma oder Serum, insbesondere humanen Ursprungs an einer hydrophoben Phase unter Anwendung eines stufenweisen Salzgradienten chromatographiert. Als Salz eignet sich insbesondere Ammoniumsulfat.
- Überraschenderweise wurde gefunden, dass mit Hilfe der hydrophoben Interaktions-
- 35 chromatographie Plasma oder Serum in wenigstens eine Immunglobulin- und eine Albumin-

haltige Fraktion im präparativen Maßstab getrennt werden kann, wobei die Chromatographie bei Raumtemperatur, ohne aufwendige Kühlvorrichtungen, durchgeführt werden kann.

Im folgenden wird das erfindungsgemäße Verfahren näher erläutert.

5

### 1. Fraktionierung

Erfindungsgemäß kann (Human-)Plasma oder (Human-)Serum verwendet werden, welches von Gerinnungsfaktoren befreit sein kann. Darüberhinaus kann auch tierisches Plasma oder  
10 Serum mit oder insbesondere ohne Gerinnungsfaktoren eingesetzt werden. Das Ausgangsmaterial kann sowohl von normalen Spenderpools als auch von ausgewählten (selektierten) Spendern mit hohen Antikörpertitern gegen virale, bakterielle oder zelluläre Antigene gewonnen werden. Bei selektiertem Ausgangsmaterial ( Hyperimmunglobulin ) wird bevorzugt solches mit hohen Titern gegen CMV, Hepathitis B, Varicella, Tetanus oder Anti-D  
15 gewählt.

Vorzugsweise wird als Ausgangsmaterial für das erfindungsgemäße Verfahren ein von den o.g. Gerinnungsfaktoren befreites Plasma, insbesondere Humanplasma oder -serum eingesetzt. Die Abtrennung der wertvollen Gerinnungsfaktoren aus Plasma, die selbst von  
20 großem therapeutischen Nutzen sind, ist bekannt.

So wird beispielsweise das aus einem Auftauprozess gewonnene Kryopräzipitat als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Faktor VIII-Konzentrat verwendet und die Faktoren II, VII, IX und X (PPSB-Komplex) werden durch Adsorption an einen Anionenaustauscher isoliert und in gereinigter Form ebenfalls therapeutisch eingesetzt.

Zur Gewinnung des bevorzugten Ausgangsmaterials für das erfindungsgemäße Verfahren kann daher insbesondere ein nach den Richtlinien des Blutspendewesens mittels Plasmapherese gewonnenes Plasma bei + 4°C aufgetaut und das Kryopräzipitat durch  
30 Zentrifugation entfernt werden. Hieraus kann Faktor VIII hergestellt werden.

Die Gerinnungsfaktoren des PPSB-Komplexes werden durch Adsorption an einen Anionenaustauscher, z. B. einen mit Diethylaminoethyl-Gruppen substituierten, vernetzten Dextran (wie z.B. DEAE-Sephadex® A50) abgetrennt.

Dem Ausgangsmaterial, mit oder ohne Gerinnungsfaktoren, wird vorzugsweise pro Liter soviel Gradientensalz, im Falle von Ammoniumsulfat soviel festes Ammoniumsulfat zugefügt, daß  
35

nach mehreren Stunden, z.B. 3-20, Rühren bei Raumtemperatur, ggf. nach Zugabe von Wasser für Injektionszwecke die Leitfähigkeit einer entsprechenden Salz- insbesondere Ammoniumsulfat-Lösung, vorliegt, die für den Chromatographiebeginn, entsprechend der gewählten Anfangskonzentration an Salz, insbesondere Ammoniumsulfat, vorgesehen ist.

- 5 Nach Zugabe von 0,5-5 % Filterhilfsmittel, z.B. Standard Super Cell oder anderer geeigneter Filterhilfsmittel wie z.B. Perlite, Harbolite oder Celite, wird die Lösung filtriert.

Das Filtrat wird als Ausgangslösung für die Chromatographie eingesetzt.

Die hydrophobe Interaktionsphase wird dabei vorzugsweise auf die gewünschte

Ausgangskonzentration an Salz, insbesondere Ammoniumsulfat entsprechend der gewählten

- 10 Konzentration in der Ausgangslösung äquilibriert.

Die chromatographische Trennung beruht auf der Wechselwirkung von hydrophoben

Domänen der Proteinmoleküle mit hydrophoben Gruppen auf der stationären chromato-

graphischen Phase. Unter physiologischen Bedingungen sind die hydrophoben Gruppen der

Proteinmoleküle nicht frei zugänglich, so dass eine Bindung an eine hydrophobe Inter-

aktionsphase nicht stattfindet. Durch Hinzufügen des Salzes, insbesondere von

Ammoniumsulfat wird die Hydrathülle des Proteins verringert, damit stehen die hydrophoben

Domänen für eine hydrophobe Interaktion zur Verfügung.

- 20 Die Hydrophobizität der stationären Phase wird erfindungsgemäß somit so gewählt, dass eine Wechselwirkung bestimmter Proteine mit der Phase stattfinden kann. Die Bindung an die Phase hängt einerseits von der Hydrophobizität der chromatographischen Matrix, andererseits von der Salz- insbesondere der Ammoniumsulfatkonzentration der Lösung ab. Da bei hohen Salz- insbesondere Ammoniumsulfatkonzentrationen eine Präzipitation der Proteine erfolgt, wird die Salz-z.B. die Ammoniumsulfatkonzentration entsprechend der Hydrophobizität der chromatographischen Phase so gewählt, dass die gewünschten Wechselwirkungen bei einer Salz- bzw. Ammoniumsulfatkonzentration, die überwiegend nicht zur Präzipitation führt, stattfinden.

- 30 Dies ergibt sich beispielsweise aus Tabelle 1, worin in Abhängigkeit von der Ammoniumsulfatkonzentration der Anteil an noch in Lösung befindlichen Proteinen angegeben ist. Bei Werten von 1,4 Mol/l Ammoniumsulfat und darüber wird kein befriedigendes Ergebnis erhalten.

- 35 Somit zeigt sich, daß die Konzentration an Salz, insbesondere Ammoniumsulfat < 1,4 Mol/l sein sollte.

Zur wirksamen Trennung von Immunglobulin- und Albuminfraktion wird dementsprechend vorzugsweise bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von  $< 1,4 \text{ Mol/l}$ , auf die gewünschtenfalls die Chromatographie-Phase und die Ausgangslösung eingestellt wird, begonnen, vorzugsweise mit einem Puffer dieser Salzkonzentration nachgewaschen und nachfolgend die Ammoniumsulfatkonzentration gesenkt.

Besonders bevorzugt wird die Trennung vorgenommen, wenn die hohe Konzentration  $0,6 \text{ bis } < 1,4 \text{ Mol/l}$ , vorzugsweise bis  $1,3 \text{ Mol/l}$ , insbesondere  $0,6 \text{ bis } 1,2 \text{ Mol/l}$ , ganz besonders  $0,7 \text{ bis } 1 \text{ Mol/l}$ , insbesondere  $0,8 \text{ bis } 0,9 \text{ Mol/l}$ , und die abgesenkte Konzentration  $0,4 \text{ bis } 0 \text{ Mol/l}$ , insbesondere  $0,3 \text{ bis } 0 \text{ Mol/l}$  beträgt.

Bei einem solchen Konzentrationsgefälle wird zunächst eine Albumin-haltige Fraktion und dann eine Immunglobulin-haltige Fraktion erhalten. Letztere kann noch Lipide enthalten, die vorteilhafterweise entfernt werden. Hierzu kann im zweiten Schritt eine weitere Konzentrationsstufe des Ammoniumsulfats eingesetzt werden, z.B. durch Beginn bei  $0,4$ , insbesondere  $0,3 \text{ Mol/l}$ , bis  $0,1 \text{ Mol/l}$ , insbesondere  $0,3 \text{ bis } 0,15 \text{ Mol/l}$ , ganz besonders bei  $0,3 \text{ Mol/l}$  und anschließende Absenkung auf kleiner  $0,1 \text{ Mol/l}$  bis  $0 \text{ Mol/l}$ . Dabei werden die Lipide erst bei der niedrigsten, ggf. Null ( $0 \text{ Mol/l}$ )-Konzentration von der Phase entfernt und damit aus der Immunglobulinfraktion, die die Phase bei höheren Ammoniumsulfatkonzentrationen verläßt, abgetrennt.

Bei der Chromatographie werden die üblichen Bedingungen, die für solche Phasen bekannt sind, eingehalten, wie z.B. pH-Wert (z.B.  $7,0$ ), Natrium(hydrogen)Phosphatpuffer oder Trishydroxymethylaminomethan als Elutionsmittel. Phosphatpuffer sind besonders bevorzugt (z.B.  $0,01 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4$ ).

Als hydrophobe Interaktionsphasen, sind für den erfindungsgemäßen Prozess die bekannten Materialien geeignet. Hierzu gehören z.B. Phenyl- oder Alkyl-substituierte Phasen auf der Basis von Copolymeren aus Glycidyl-methacrylat und Ethylenglycol-dimethacrylat, Copolymere aus Polystyrol und Divinylbenzol oder mit Dextran oder Polymeren gecoatete Kieselgele.

Als besonders geeignet erwiesen sich Alkyl- und ganz besonders Phenyl-substituierte Copolymere aus Glycidyl-methacrylat und Ethylenglycoldimethacrylat.

Diese sind unter den Handelsnamen TSK-Phenyl 5PW<sup>®</sup> und Toyopearl-Phenyl 650<sup>®</sup> kommerziell erhältlich.

Hierfür kann erfindungsgemäß beispielsweise eine Anfangs-Ammoniumsulfatkonzentration von 0,7 bis 1,0 Mol/l, vorzugsweise von 0,8 bis 1,0, insbesondere 0,9 Mol/l, für die chromatographische Separation gewählt werden.

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, führt die chromatographische Trennung an TSK-Phenyl 5PW<sup>®</sup> bei solchen Konzentrationen zu besonders guten Ergebnissen.

So kann, wie oben beschrieben, die auf eine Ammoniumsulfatkonzentration von 0,9 Mol/l eingestellte Ausgangslösung auf die äquilibrierte hydrophobe Chromatographiephase aufgetragen werden. Bei dieser Salzkonzentration erhält man eine Fraktion 1, die die Phase ungebunden passiert. Die gebundenen Proteine werden mit 0,01 Mol/l Natriumphosphat, pH 7,0 als Fraktion 2 von der Phase abgelöst, d.h. die Ammoniumsulfatkonzentration wird hier auf 0 Mol/l abgesenkt.

15

In **Tabelle 3** ist die Zusammensetzung der erhaltenen chromatographischen Fraktionen dargestellt.

Wie hieraus ersichtlich ist, erhält man eine Fraktion 1, die als Albuminfraktion bezeichnet wird und die in der Zusammensetzung einem Überstand II/III der Alkoholfraktionierung nach Cohn sehr ähnlich ist. Sie enthält die wichtigen Proteine Albumin, Transferrin, Antithrombin III und  $\alpha$ -Antitrypsin.

20

In der Fraktion 2 sind fast quantitativ alle Immunglobuline enthalten und ähnelt daher der nach dem Kälte-Äthanol-Verfahren erhaltenen Zusammensetzung einer Paste II/III.

Wie aus Tabelle 3 weiter zu ersehen, sind in der Fraktion 2 auch alle Lipide und Lipoproteine enthalten. Diese können die Weiterverarbeitung der Fraktion 2 zu therapeutisch anwendbaren Proteinlösungen erschweren, so dass es sich als vorteilhaft erwiesen hat, einen weiteren Elutionsschritt zur Gewinnung einer 3. Fraktion in den Prozess zu integrieren.

Hierzu kann nach Gewinnung der Fraktion 1 bei der höchsten Konzentration, z.B. 0,9 Mol/l Ammoniumsulfat begonnen und dann mit einem Stufengradienten weitergearbeitet werden. Beispielsweise kann bei 0,3 Mol/l Ammoniumsulfat die Fraktion 2 isoliert werden.

30

Diese immunglobulinhaltige Fraktion 2 unterscheidet sich in der Proteinzusammensetzung nicht von der oben beschriebenen Fraktion (Tabelle 3, Fraktion 2), außer, dass der Gehalt an Lipoproteinen kleiner 5 % ist.

35

Die Lipoproteinfraktion bleibt bei 0,3 Mol/l und höheren Ammoniumsulfatkonzentrationen an die Chromatographiephase gebunden und kann mit 0,01 Mol/l Natriumphosphat, pH 7,0 als Fraktion 3 von der Phase eluiert werden, d.h. hier wird die Ammoniumsulfatkonzentration auf 0 Mol/l abgesenkt.

5

Vorzugsweise werden somit 3 Fraktionen bei der erfindungsgemäßen hydrophoben Interaktionschromatographie separiert, nämlich zunächst die Albuminfraktion, dann die Immunglobulinfraktion und dann die Lipoproteinfraktion.

10 Schematisch ist der erfindungsgemäße Prozess in **Abbildung 1** dargestellt.

## 2. Rezyklisierung

Bei der großtechnischen Anwendung des Verfahrens werden Puffersalz- wie Ammoniumsulfat-haltige Pufferlösungen in beträchtlichen Mengen benötigt. Um diesen Verbrauch möglichst zu minimieren, wird erfindungsgemäß ein Rezyklisierungsverfahren angewendet, wie in Abbildung 2 dargestellt.

20 Dabei kann der auf die gewünschte Konzentration eingestellte z.B. Ammoniumsulfatpuffer 1 (hohe Konzentration) als Permeat aus der gewonnenen ersten Fraktion z.B. mittels geeigneter Ultrafiltrationsmembranen rückgeführt werden, während die erste Fraktion kontinuierlich gesammelt und ankonzentriert wird. Zwecks Abtrennung der zweiten und ggf. dritten Fraktion wird dann ein Puffer mit der jeweils gewünschten Konzentration durch Mischen des Ammoniumsulfatpuffers 1 und einem Nicht-Gradientensalz, d.h. Nicht-Ammoniumsulfatpuffer 2 oder durch alleinigen Einsatz des Puffers 2 abgesenkt wie erfindungsgemäß angegeben und die zweite bzw. dritte Fraktion abgetrennt, je nachdem wie viele Fraktionen gewünscht sind.

30 Vorzugsweise werden, wie oben beschrieben, drei Fraktionen hergestellt durch Anwendung eines Stufengradienten nach Abtrennung der Fraktion 1, wobei die vorstehend angegebenen Ammoniumsulfatkonzentrationen gewählt werden.

Das kontinuierliche Ankonzentrieren der Fraktionen kann z.B. mittels Ultrafiltration erfolgen.

35 Es wird ferner bevorzugt, die Chromatographiephase nach je einem Zyklus mit Natronlauge aus einem Vorratsbehälter 3 zu reinigen, wobei gleichzeitig eine Sterilisation erfolgt.

Beispielsweise kann nach der Beladung der Säule mit der auf einem Puffer 1 eingestellten und filtrierten Plasmaprotein-Lösung zur Gewinnung der Fraktion 1 mit Puffer 1 (z.B. 0,9 Mol/l Ammoniumsulfat, 0,01 Mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7,0) nachgewaschen werden, um die gesamte  
5 Fraktion 1 zu gewinnen. Die so gewonnene Fraktion 1 wird aufgefangen und kontinuierlich über eine Ultrafiltrationseinheit mit einem cut off von 10 KD ankonzentriert. Das hierbei gewonnene Permeat wird in den Vorratskessel für Puffer 1 zurückgeführt.

Zur Elution der Fraktion 2 wird die Salz- bzw. Ammoniumsulfatkonzentration wie angegeben  
10 abgesenkt, wobei beispielsweise ein Mischpuffer hergestellt werden kann oder ein Puffer 2, welcher kein Salz, z.B. Ammoniumsulfat enthält, allein gewählt wird, je nachdem, wie viele Trennstufen gewünscht sind.

Bei einem Stufengradient können, beispielsweise zur Elution der Fraktion 2, die Puffer 1  
15 (0,9 Mol/l Ammoniumsulfat, 0,01 Mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0) und Puffer 2 (0,01 Mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0) online im Verhältnis z.B. 1:3 gemischt werden. Dieses Mischungsverhältnis ergibt einen Elutionspuffer für die Fraktion 2 mit der gemischten Konzentration z.B. von 0,3 Mol/l Ammoniumsulfat, 0,01 Mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0.

Die gesammelte Fraktion 2 wird ebenfalls online über eine Ultrafiltrationseinheit mit einem cut  
20 off von 10-30 KD ankonzentriert. Das hierbei anfallende Permeat wird verworfen.

Mit Puffer 2 (0,01 Mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0) werden sodann die Lipoproteine von der hydrophoben Phase losgelöst und verworfen.

Dieses Verfahren kann unter Änderungen der Puffer/Salz-konzentrationen und  
Mischverhältnisse im erfindungsgemäßen jeweils gewünschten Bereich und üblichen, dem Fachmann für die genannten Chromatographiephasen bekannten Bedingungen variiert werden. So kann z.B. bei einer Puffer 1-Konzentration von 1 Mol/l mit Puffer 2 eine 1:1 – 1:5  
etc. Mischung hergestellt werden.

30 Beim Prozessieren von großen Mengen werden mehrere chromatographische Zyklen durchgeführt.

Vorzugsweise wird daher nach jedem Separationszyklus die hydrophobe Phase mit 1,0 Mol/l NaOH gereinigt und gleichzeitig sterilisiert. Die Natronlauge befindet sich im Vorratsbehälter

35 3.

### 3. Weiterverarbeitung

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren an der hydrophoben Phase gewonnenen Fraktionen 1 und 2 können nach bekannten Verfahren, wie z.B. denen in den eingangs  
5 erwähnten Druckschriften beschriebenen zu therapeutisch anwendbaren hochreinen Plasmaprotein-Lösungen weiterverarbeitet werden. Solche Präparate werden bei jeweiligen Mangel- oder Krankheitszuständen eingesetzt, z.B. können bei Infektionen Präparate, die aus selektiertem Ausgangsmaterial erfindungsgemäß hergestellt wurden, wie z.B. solche  
10 enthaltend anti-CMV oder anti-HBs, anti-Varicella, Tetanus oder Anti-D bei entsprechender Infektion verabreicht werden.

Mengen und Abreichungsform sind hierbei jeweils bekannt, z.B. als Injektionen oder i.m.-  
Injektion oder i.v.-Infusion, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung neben dem  
15 Wirkstoff die bekannten Hilfsstoffe aufweisen können. Hierzu gehören z.B. Elektrolyte, Aminosäuren oder Zucker.

#### a) Immunglobulin G

Beispielsweise kann aus der Immunglobulinfraction (Fraktion 2) ein i. v. verträgliches,  
20 insbesondere Immunglobulin G hergestellt werden. Hierzu können bekannte Methoden wie schon in DE 3640513C2 sowie EP-B 447 585 beschrieben, angewandt werden. Diese Verfahrensweise ist in Abbildung 3 dargestellt und umfaßt im wesentlichen Anionenaustauscherchromatographie, ggf. Virenfiltration, Octansäurebehandlung, Kationenaustauscherchromatographie und übliche Konzentrations-, Filtrations- und  
Sterilisationsschritte.

So kann die ankonzentrierte Fraktion 2 von der hydrophoben Interaktionschromatographie  
z.B. mittels Diafiltration auf 0,05-0,10 Mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,5, vorzugsweise auf 0,06 Mol/l  
30  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,5, umgepuffert werden.

Zur weiteren Aufarbeitung wird diese Lösung einer Anionenaustauschchromatographie  
unterworfen. Hierzu wird der Anionenaustauscher mit 0,01-0,05 Mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,5,  
vorzugsweise mit 0,03 Mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,5, äquilibriert und die diafiltrierte Proteinlösung  
mit Wasser für Injektionszwecke (WFI) verdünnt, so dass auch hier eine Salzkonzentration  
35 von 0,01-0,05 Mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,5, vorzugsweise mit 0,03 Mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,5, vorliegt.



Unter diesen Bedingungen passiert eine Immunglobulin G-Rohfraktion ungebunden die Säule, während alle anderen Proteine an die chromatographische Phase binden.

5 Mit einem Puffer hoher Salzkonzentration (0,02 Mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1,0 Mol/l  $\text{NaCl}$ , pH 6,5) werden die gebundenen Proteine eluiert.

Die Immunglobulin-G Rohfraktion wird gegebenenfalls über einen Virenfilter filtriert, mittels Ultra-/Diafiltration ankonzentriert und auf 0,01-0,05 Mol/l Natriumacetat, pH 5,5, vorzugsweise 0,02 Mol/l Natriumacetat, pH 5,5, umgepuffert.

10

Diese eingestellte Rohfraktion besteht aus > 99 % Immunglobulin-G, ist jedoch mit proteolytischen Enzymen verunreinigt.

15 Diese können gemäß EP 0447585B1 mit Oktansäure entfernt werden. Hierzu wird die konditionierte Lösung mit 0,4 bis 1,5 Vol%, vorzugsweise 0,8 bis 1,0, insbesondere 0,8 % Oktansäure behandelt und unter Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  filtriert.

Anschließend erfolgt eine Virusinaktivierung mit 0,3 % Tri-n-butylphosphat und 1 % Tween 80. Nach Abschluß der Reaktionszeit wird die Lösung auf eine Leitfähigkeit eines 0,02 Mol/l Natriumacetat, pH 5,0,-Puffers mit Wasser für Injektionszwecke eingestellt.

20

Die Agentien der Oktansäurebehandlung und Virusinaktivierung sowie die in der Lösung enthaltenen IgG-Aggregate werden durch Chromatographie an einem Kationenaustauscher entfernt. Hierzu trägt man die eingestellte Immunglobulin G-Lösung auf den äquilibrierten Kationenaustauscher auf, wäscht mit 0,02 Mol/l Natriumacetat, pH 5,0, die Agentien aus und eluiert die Immunglobulin G-Wertfraktion mit einem Puffer, bestehend aus 0,02 Mol/l Natriumacetat, 0,3 Mol/l Natriumchlorid, pH 5,0. Die Reinigung der Säule erfolgt durch 0,02 Mol/l Natriumacetat, 1,0 Mol/l Natriumchlorid, pH 5,0 und 1,0 Mol/l  $\text{NaOH}$ .

30 Die Immunglobulin G-Fraktion wird gegen 0,3 Mol/l Glycin, pH 5,0 diafiltriert und auf eine Proteinkonzentration von 50 g/l ankonzentriert.

Analog kann das hochreine, iv-verträgliche IgG-Präparat auch nach anderen bekannten Verfahren aufgearbeitet werden.

35 Die so hergestellten intravenös verträglichen Immunglobulin G-Präparate weisen gegenüber herkömmlichen Lösungen, die üblicherweise durch Präzipitationen aus Plasma gewonnen

werden, einige Vorteile auf. So entspricht beispielsweise die IgG-Subklassenzusammensetzung der natürlichen, im Plasma vorkommenden Verteilung. Der IgA-Gehalt ist kleiner 0,15 % und der IgM-Gehalt kleiner 0,02 % des Gesamtproteingehaltes. Der Anteil an IgG-Aggregaten ist kleiner 0,25 %. Mögliche, zu Unverträglichkeitsreaktionen führende

- 5 Verunreinigungen, wie Prekallikreinaktivator, Prekallikrein, Kallikrein, Kininogen, Plasmin, Plasminogen und Faktor XI sind nicht nachweisbar. Alle anderen analytischen Parameter entsprechen der Europäischen Pharmakopoe für i. v. Immunglobulin G-Präparate.

Somit weist das so gewonnene Präparat alle erforderlichen Kriterien auf und unterscheidet sich von dem bekannten Produkt zum einen durch den höheren IgG-Anteil und ferner hinsichtlich der Subklassenzusammensetzung.

10

#### **b) Albumin, Antithrombin III, Transferrin**

- 15 Aus der erfindungsgemäß hergestellten Fraktion 1 lassen sich beispielsweise Antithrombin-III (AT-III), Transferrin und Albumin gewinnen.

Ein entsprechendes Verfahren ist in Abbildung 4 dargestellt und umfaßt im wesentlichen Affinitätschromatographie, Anionenaustauscherchromatographie, Virusinaktivierung sowie

20

So läßt sich aus der ultra- und diafiltrierten Fraktion 1 mittels Affinitätschromatographie an einem Heparinträger Antithrombin III aus diesen enthaltenden Ausgangsprodukten gewinnen. Eine solche Vorgehensweise ist in der EP-A 844 254 als Vorreinigungsstufe zur Gewinnung von von Unreinheiten befreitem Antithrobin III beschrieben, wobei dort anschließend eine Hitze- und/oder Metallchelatbehandlung erfolgt. Im erfindungsgemäßen Verfahren kann die Affinitätschromatographie somit ebenfalls durchgeführt werden, wobei hier eine niedrig konzentrierte Kochsalzlösung wie z.B. 0,1 bis 0,2 Mol/l Natriumchlorid zur Bindung von Antithrobin III und eine höhere Kochsalzkonzentration wie z.B. 1,0 bis 2,0 Mol/l Natriumchlorid zur Eluierung führen. So kann man die Fraktion 1 auf ein Puffermilieu von 0,02 Mol/l,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,150 Mol/l NaCl, pH 7,0, einstellen und trägt auf die Affinitätsphase auf.

30

Albumin und Transferrin passieren die Säule ungebunden. Man wäscht die Säule mit 0,02 Mol/l,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,4 Mol/l NaCl, pH 7,0 und eluiert anschließend das an den

35

Heparinträger gebundene AT-III mit 0,02 Mol/l,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2,0 Mol/l NaCl, pH 7,0. Die gewonnene AT-III Lösung wird auf physiologische Bedingungen umgepuffert und kann nach

bekannten Methoden, wie z. B. Virusfiltration und Pasteurisierung zu einem therapeutisch anwendbaren Präparat weiterverarbeitet werden.

5 Die Albumin und Transferrin enthaltende Durchlauffraktion der Affinitätschromatographie kann gemäß DE 3733181C1 zu Transferrin und gemäß EP 0402205B1 oder EP 0792887A1 zu Albumin aufgetrennt werden.

So kann beispielsweise nach Umpufferung der o. g. Durchlauffiltration der Affinitätschromatographie auf 0,02 Mol/l Tris, 0,030 Mol/l NaCl, pH 7,0, die Lösung auf einen Anionenaustauscher aufgetragen werden. Das Transferrin wird als Durchlauffraktion  
10 aufgefangen und mittels bekannter Methoden virusinaktiviert und weiterverarbeitet. Die vom Anionenaustauscher anschließend mit 0,02 Mol/l Tris, 1,0 Mol/l NaCl, pH 7,0, eluierte Albuminfraktion kann beispielsweise auf eine Leitfähigkeit von 1,8 mS/cm mit einem Natriumacetatpuffer, pH 6,0, eingestellt und erneut einer Anionenaustauschchromatographie unterzogen werden. Durch Umstellen des pH-Wertes auf 5,2 werden eventuell vorhandene  
15 Spuren von Transferrin entfernt. Die Elution des Albumins vom Anionenaustauscher erfolgt bei pH 4,5 und einer Leitfähigkeit von 1,8 mS/cm. Die Weiterverarbeitung zu einem therapeutisch anwendbaren Albuminpräparat erfolgt nach bekannten Methoden.

20 Für alle in den obengenannten Verfahren angewandten chromatographischen Schritte werden bekannte Materialien verwendet.

Als Kationenaustauscher können z.B. CM-Accell®, SP-Spherodex®, SP-Trisacryl-LS® oder Fraktogel-TSK-SP 650®, Poros HS® oder S-HyperDF® oder SOURCE-30S®, CM-HyperDF® verwendet werden und die Salzkonzentration entsprechend eingestellt werden.

Als Anionenaustauscher können z.B. QMA-Accell® DEAE-Spherosil® oder DEAE-Sephacrose®, PorosHQ®, Q-HyperDF®, SOURCE 30Q® eingesetzt werden.

Weitere geeignete Materialien sind CM-Accell®, SP-Sperodex-M® oder auf der Basis synthetischer Polymere hergestellte Phasen wie SP-Trisacryl-LS® und CM-Trisacryl-LS®. Für die Affinitätschromatographie kann z.B. Heparin-Sephacrose® oder Heparin- immobilisierte synthetische Polymere wie z.B. Toyopearl AF-Heparin 650M® eingesetzt werden, wobei als  
30 Puffer ebenfalls die o.g. Zusammensetzungen gewählt werden können.

Vorzugsweise werden im erfindungsgemäßen Verfahren chromatographische Medien auf der Basis synthetischer Polymere eingesetzt, wie die unter den Handelsnamen Poros®, Source®, Macroprep®, TSK®, Toyopearl® und Hyper D® kommerziell erhältlichen.

35 Die genannten Phasen sind substituiert als Anionen-, Kationenaustauscher, Hydrophobe-Interaktions- und Affinitätsmatrix verfügbar. Dabei bilden tertiäre oder quaternäre

Aminogruppen Anionenaustauscher, Beladung mit Sulfoalkyl oder Carboxyalkylgruppen  
Kationenaustauscher, Substituenten wie Alkyl oder Phenyl bzw. Heparin-Gruppen  
Hydrophobe Phasen bzw. Affinitätsmatrices. Die jeweiligen Puffermedien und  
Elutionsbedingungen hierfür sind dem Fachmann bekannt.

5

Aufgrund ihrer relativen Druckstabilität erlauben sie auch bei geringer Partikelgröße hohe  
Flußraten. Damit lassen sich die beschriebenen Prozesse in kurzer Zeit und mit hohem  
Durchsatz ökonomisch gestalten.

10

Darüberhinaus bieten diese Chromatographiephasen den Vorteil, dass sie chemisch inert  
gegenüber sterilisierenden Agentien und somit für die Herstellung von pharmazeutischen  
Produkten besonders geeignet sind.

15

Zur Sterilisation können Behandlungen, vorzugsweise vor dem Chromatographie-Schritt, mit  
β-Propiolacton, TNBP/Tween, TNBP/Na-Cholat, TNBP, gegebenenfalls in Kombination mit  
UV-Bestrahlung oder Virenfiltration angewendet werden. Die eingesetzten Filter wie z.B.  
Planova®, Virosolv®, UltraporDV50® sind bekannt.

20

Die auf diese Weise erfindungsgemäß hergestellten Produkte können flüssig oder lyophilisiert  
gelagert werden.

Der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt darin, daß auf schnelle und einfache  
Weise die genannten Ausgangsmaterialien so gereinigt werden können, daß die erhaltenen  
reinen Produkte ohne wesentliche Ausbeuteverluste gewonnen werden können und ihrer  
natürlichen Zusammensetzung im wesentlichen entsprechen.

Die Erfindung wird durch nachstehende Beispiele erläutert.

### Beispiel 1

30

Als Ausgangsmaterial werden 5,4 l eines von Gerinnungsfaktoren befreiten Humanplasmas  
eingesetzt. Die Entfernung der Gerinnungsfaktoren erfolgt nach bekannten Methoden durch  
Abtrennung des Kryopräzipitates und durch Adsorption der PPSB-Faktoren an DEAE-  
Sephadex-A50®.

35

Zu diesem vorbehandelten Plasma werden pro Kilogramm 1,2 Mol Ammoniumsulfat zugegeben und 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird mit Wasser für Injektionszwecke (WFI) auf eine Leitfähigkeit von 112 mS/cm (20°C) entsprechend der Leitfähigkeit einer 0,9 molaren Ammoniumsulfatlösung verdünnt und 6-12 h weitergerührt.

- 5 Nach Zugabe von 2 % (w/w) Filterhilfsmittel (z. B. Standard Super Cell) und erneutem Rühren über 1 Stunde wird die Lösung über einen Tiefenfilter, z. B. Seitz Supra 80P, geklärt.

Eine Stahlsäule (373 ml) gefüllt mit TSK-Phenyl 5PW<sup>®</sup> wird mit 0,9 Mol/l Ammoniumsulfat, 0,01 Mol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0 äquilibriert. Bei einem Fluß von 70 ml/min wird die vorbereitete und filtrierte Plasmaproteinlösung in Portionen von 370 ml aufgetragen. Nach Ende des Auftrages wird mit 5 Säulenvolumen des Äquilibrierpuffers nachgewaschen und diese Fraktion gesammelt (Fraktion 1). Während des Sammelns der Fraktion 1 erfolgt eine gleichzeitige Ultrafiltration an einer 10 KD Membran, z. B. Omega<sup>®</sup>, Pall-Filtron, wobei das Permeat in den Vorratsbehälter des Äquilibrierpuffers zurückgeführt wird.

15

Danach wird mit dem 4fachen Säulenvolumen eines Elutionspuffer, bestehend aus 0,3 Mol/l Ammoniumsulfat, 0,01 Mol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0, die Fraktion 2 gewonnen.

Der Elutionspuffer wird über ein Mischventil aus dem Äquilibrierpuffer (0,9 Mol/l Ammoniumsulfat, 0,01 Mol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0) und einer 0,01 Mol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0, Lösung hergestellt. Hierzu werden die beiden Puffer im Verhältnis 1:3 online gemischt.

20

Durch Aufgabe von 3 Säulenvolumen 0,01 Mol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0-Puffer wird die Lipoprotein-Fraktion (Fraktion 3) von der Säule abgelöst und verworfen.

Nach einem Reinigungsschritt mit dem 3fachen Säulenvolumen einer 1 Mol/l NaOH-Lösung wird die Säule mit WFI freigewaschen und erneut äquilibriert.

Zur Aufarbeitung der gesamten eingesetzten filtrierte Proteinlösung sind 26 Zyklen erforderlich, wobei die Fraktionen 1 und 2 jeweils in einem Sammelbehälter aufgefangen werden.

30

Danach erfolgt eine Sterilfiltration der separatierten Fraktionen 1 und 2.

Ausbeute, Immunglobulin G in Fraktion 2, 90,3 %

35 Ausbeute, Albumin in Fraktion 1, 100 %

## Zusammensetzung der Fraktionen 1 und 2 in der Kapillarzonen-elektrophorese

	Fraktion 1	Fraktion 2
$\gamma$ -Globulin (%)	0	61,5
$\beta$ -Globulin (%)	6,1	13,5
$\alpha_1$ -Globulin (%)	4,3	2,1
$\alpha_2$ -Globulin (%)	7,7	13,3
Albumin (%)	81,9	1,8
Fibrinogen (%)	0	7,6

**Beispiel 2**

Man verfährt wie in Beispiel 1.

10 Die von Gerinnungsfaktoren befreite, mit Ammoniumsulfat versetzte und filtrierte Proteinlösung wird, wie in Beispiel 1 beschrieben, an einer TSK-Phenyl 5PW<sup>®</sup>-Säule chromatographiert.

Nach Elution der Fraktion 1 werden mit 0,01 Mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0, die Immunglobuline und Lipoproteine in einer Fraktion von der Säule abgelöst.

Die erhaltenen Fraktionen zeigen folgende Ausbeuten:

Fraktion 1:	Albuminausbeute	100 %
Fraktion 2:	Ausbeute Immunglobulin G	95,5 %

20

**Beispiel 3**

Man verfährt wie in Beispiel 1.

Die von Gerinnungsfaktoren befreite, mit Ammoniumsulfat versetzte und filtrierte Proteinlösung wird an einer 3 l Säule (180x250 mm), gefüllt mit Toyopearl-Phenyl 650 M<sup>®</sup>, chromatographiert.

- 5 Die Vorgehensweise entspricht dem Beispiel 1.  
Pro Zyklus werden 2,4 l der Ausgangslösung bei einer Flußrate von 300 ml/min prozessiert. Mit dieser Säule sind 3 Zyklen zur Aufarbeitung von 4 l Plasma notwendig.

Wie in Beispiel 1 werden 3 Fraktionen gesammelt.

10

Die erhaltenen Fraktionen zeigen folgende Ausbeuten:

Fraktion 1:	Albuminausbeute	100 %
Fraktion 2:	Ausbeute Immunglobulin G	96 %

15

#### Beispiel 4

Man verfährt wie in Beispiel 2.

20

Die von Gerinnungsfaktoren befreite, mit Ammoniumsulfat versetzte und filtrierte Proteinlösung wird an einer 2,5 l Säule, gefüllt mit Toyopearl-Phenyl 650 M<sup>®</sup>, chromatographiert.

Die Vorgehensweise entspricht dem Beispiel 2.

Pro Zyklus werden 2,4 l der Ausgangslösung bei einer Flußrate von 125 ml/min in 2 Fraktionen aufgetrennt. Hierzu werden 3 Zyklen benötigt.

- 30 Die erhaltenen Fraktionen zeigen folgende Ausbeuten:

Fraktion 1:	Albuminausbeute	100 %
Fraktion 2:	Ausbeute Immunglobulin G	95 %

35

#### Beispiel 5

Man verfährt wie in den Beispielen 1, 2, 3 oder 4. Anstelle eines polyvalenten Ausgangsplasmas wird ein vorselektiertes Humanplasma mit einem hohen Titer gegen Cytomegalievirus (anti-CMV) eingesetzt und entsprechend den Beispielen 1 oder 2 oder 3 oder 4 prozessiert.

Die daraus erhaltene Fraktion 2 zeigt folgende Ausbeuten:

	Ausbeute Immunglobulin G	90,5 %
10	Ausbeute Anti-CMV-Titer	78 %

#### **Beispiel 6**

15 Man verfährt wie in den Beispielen 1, 2, 3 oder 4. Anstelle eines polyvalenten Ausgangsplasmas wird ein vorselektiertes Humanplasma mit einem hohen Titer gegen Hepatitis-B-Virus (anti-HBs) eingesetzt und entsprechend den Beispielen 1 oder 2 oder 3 oder 4 prozessiert.

20 Die daraus erhaltene Fraktion 2 zeigt folgende Ausbeuten:

	Ausbeute Immunglobulin G	92,0 %
	Ausbeute Anti-HBs-Titer	82 %

#### **Beispiel 7**

Man verfährt wie in den Beispielen 1, 2, 3 oder 4. Anstelle eines polyvalenten Ausgangsplasmas wird ein vorselektiertes Humanplasma mit einem hohen Titer gegen Anti-D eingesetzt und entsprechend den Beispielen 1 oder 2 oder 3 oder 4 prozessiert.

30 Die daraus erhaltene Fraktion 2 zeigt folgende Ausbeuten:

	Ausbeute Immunglobulin G	91,2 %
	Ausbeute Anti-D-Titer	54 %

35

#### **Beispiel 8**



Ausbeute Immunglobulin G: 74 %

Analytische Daten einer 5 % Immunglobulin G-Lösung

5

Antikomplementäre Aktivität	0,68 CH <sub>50</sub> /mg Protein
Immunglobulin A	0,14 %
Immunglobulin M	0,02 %

Subklassen:

IgG <sub>1</sub>	57,6 %
IgG <sub>2</sub>	33,3 %
IgG <sub>3</sub>	5,5 %
IgG <sub>4</sub>	3,6 %

Cellulose-Acetat-Elektrophorese	100 % $\gamma$ -Globulin
---------------------------------	--------------------------

Prekallikreinaktivator	neg.
Prekallikrein	neg.
Kallikrein	neg.
Kininogen	neg.
Plasmin	neg.
Plasminogen	neg.
Faktor XI	neg.

HPSE-Chromatogramm siehe Abbildung 5

**Beispiel 9**

Eine gemäß Beispiel 1 hergestellte Albuminhaltige Fraktion 1 wird mittels Ultra- und Diafiltration auf 0,02 Mol/l,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,150 Mol/l NaCl, pH 7,0 eingestellt.

5

Eine 50 ml Säule (1,5 x 25 cm), gefüllt mit AF-Heparin Toyopearl<sup>®</sup>, wird mit 0,02 Mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,150 Mol/l NaCl, pH 7,0 äquilibriert.

10

100 ml der konditionierten Albumin-haltigen Fraktion werden mit einem Fluß von 7 ml/min auf die Säule aufgetragen. Man spült mit 5 Säulenvolumen des Äquilibrierungspuffers nach und fängt diese Albumin-haltige Fraktion auf.

15

Mit 0,02 Mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,4 Mol/l NaCl, pH 7,0 wird die Säule nachgewaschen und diese Fraktion verworfen. Die Elution des AT-III erfolgt mit einem Puffer, bestehend aus 0,02 Mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2,0 Mol/l NaCl, pH 7,0. Diese Wertfraktion wird mittels Ultra-/Diafiltration auf PBS umgepuffert, ankonzentriert und sterilfiltriert.

20

Die erhaltene AT-III Lösung zeigt folgende Daten:

AT-III Ausbeute	91 %
Protein	1,1 g/l
AT-III-Aktivität	805 % d.N.
AT-III-Antigen	1,0 g/l
Albumin	< 0,006 g/l

HPSE-Chromatogramm siehe Abbildung 6

Tabelle 1

**Ermittlung der Ammoniumsulfatkonzentration zur hydrophoben  
Interaktionschromatographie**

	Protein (g/l)	IgG (g/l)	IgA (g/l)	IgM (g/l)	Albumin (g/l)
Ausgang	26,7	3,59	0,78	0,34	15,8
0,5 Mol Ammoniumsulfat	26,7	3,59	0,78	0,34	15,8
0,7 Mol Ammoniumsulfat	26,7	3,59	0,78	0,34	15,8
0,8 Mol Ammoniumsulfat	26,7	3,59	0,78	0,34	15,8
1,0 Mol Ammoniumsulfat	26,0	3,40	0,72	0,35	14,8
1,2 Mol Ammoniumsulfat	24,9	1,93	0,38	0,21	15,7
1,4 Mol Ammoniumsulfat	22,0	0,73	0,16	0,10	14,4

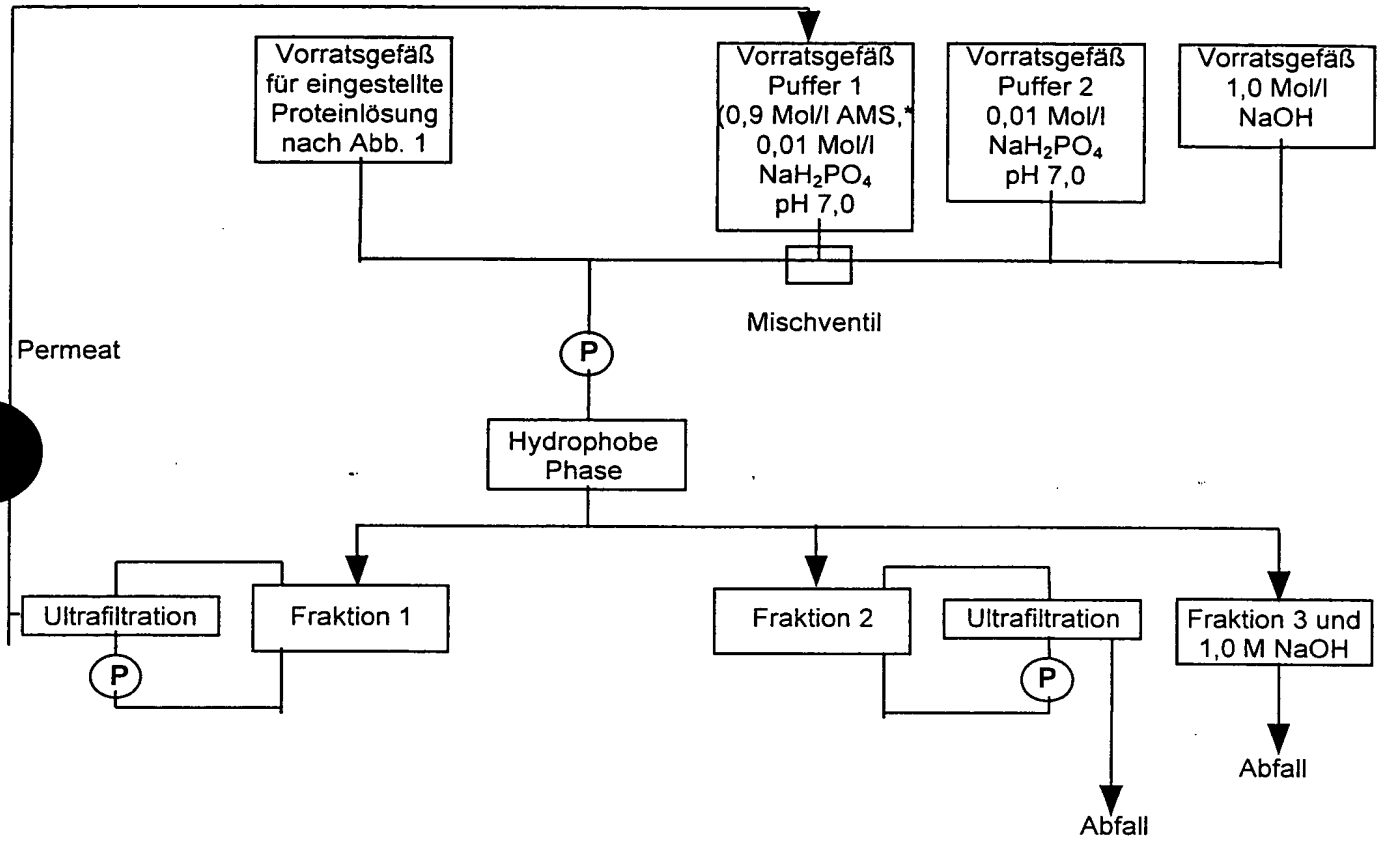
Tabelle 2

**Beispiel für eine erfindungsgemäße**  
**Hydrophobe Interaktionschromatographie von Humanplasma bei unterschiedlichen**  
**Ammoniumsulfatkonzentrationen**

	0,7 Mol	0,8 Mol	1,0 Mol
<b>Ausgang</b>			
Albumin (%)	100	100	93,7*
IgG (%)	100	100	94,7*
<b>Fraktion 1</b>			
Albumin (%)	> 95,0	> 95,0	> 95,0
IgG (%)	34,4	< 2,6	< 2,0
<b>Fraktion 2</b>			
Albumin (%)	1,4	1,8	3,3
IgG (%)	57,2	> 95,0	> 95,0

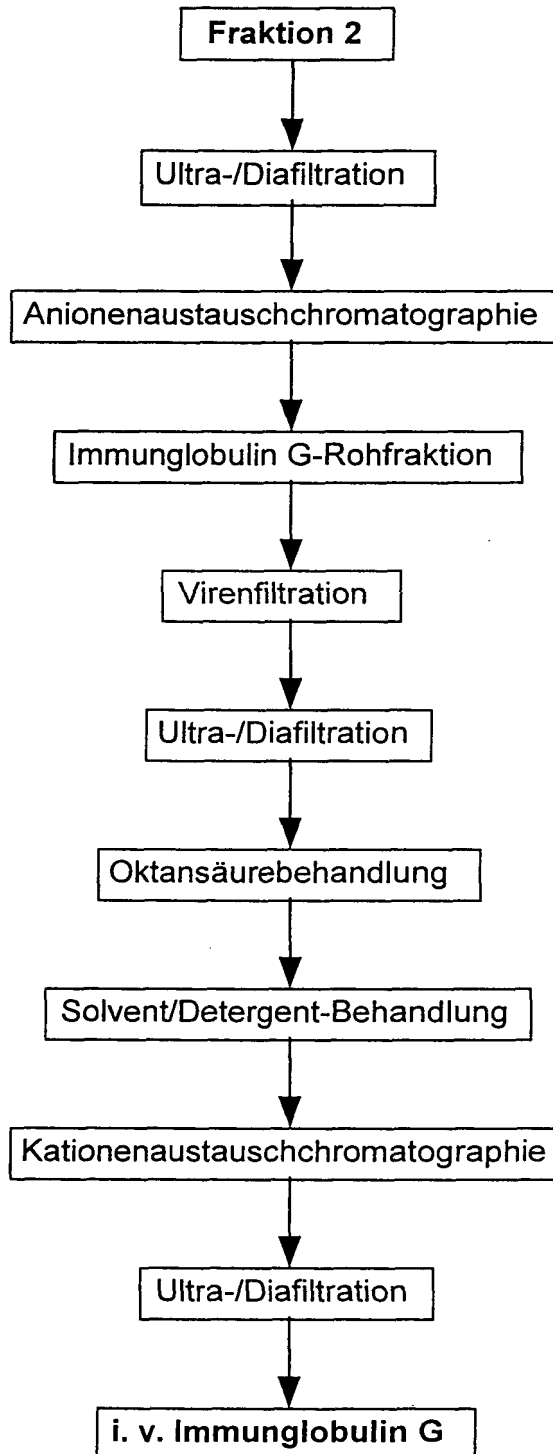
\*Präzipitation durch Ammoniumsulfat

Abbildung 2

Verfahrensschema

\*AMS=Ammoniumsulfat

Abbildung 3

Herstellschema für i.v. Immunglobulin G

## Abbildung 4

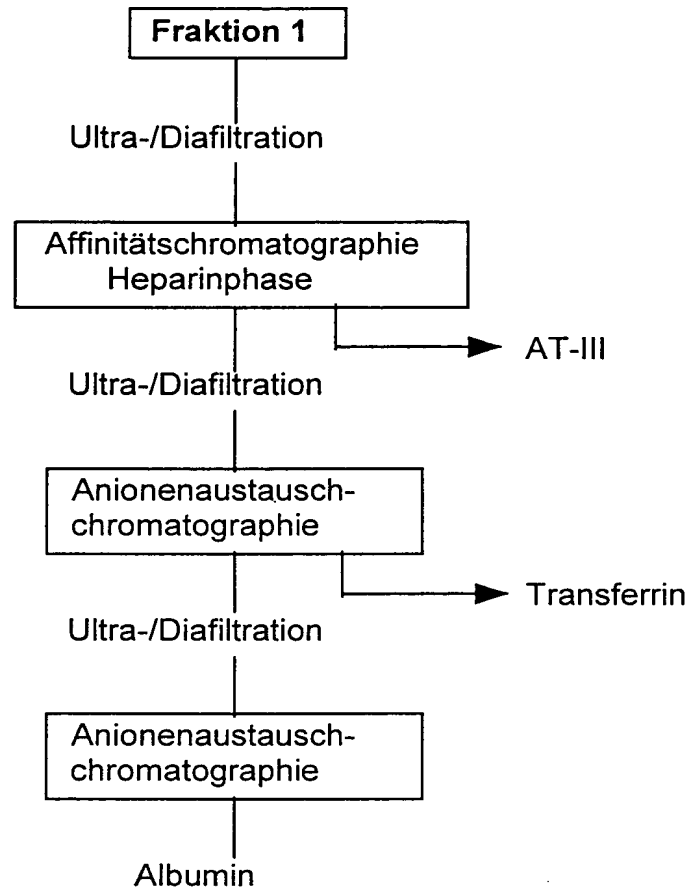
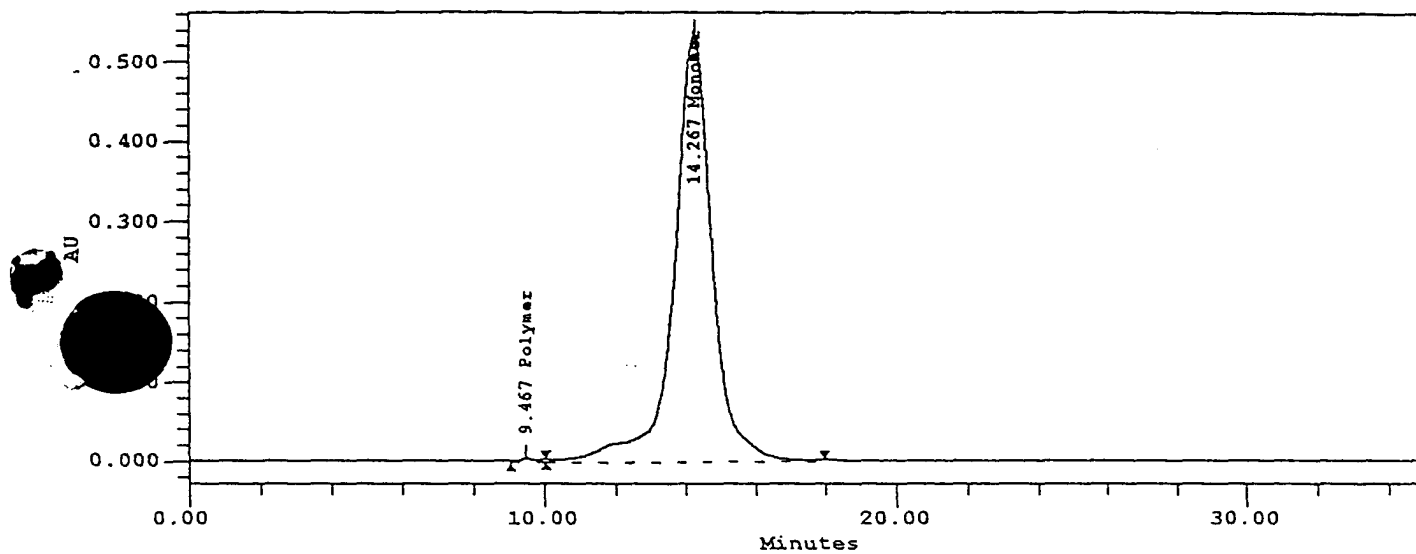
Herstellschema von AT-III, Transferrin und Albumin

Abbildung 5

HPSE-Chromatogramm einer gemäß Beispiel 8  
hergestellten Immunglobulin G-Lösung



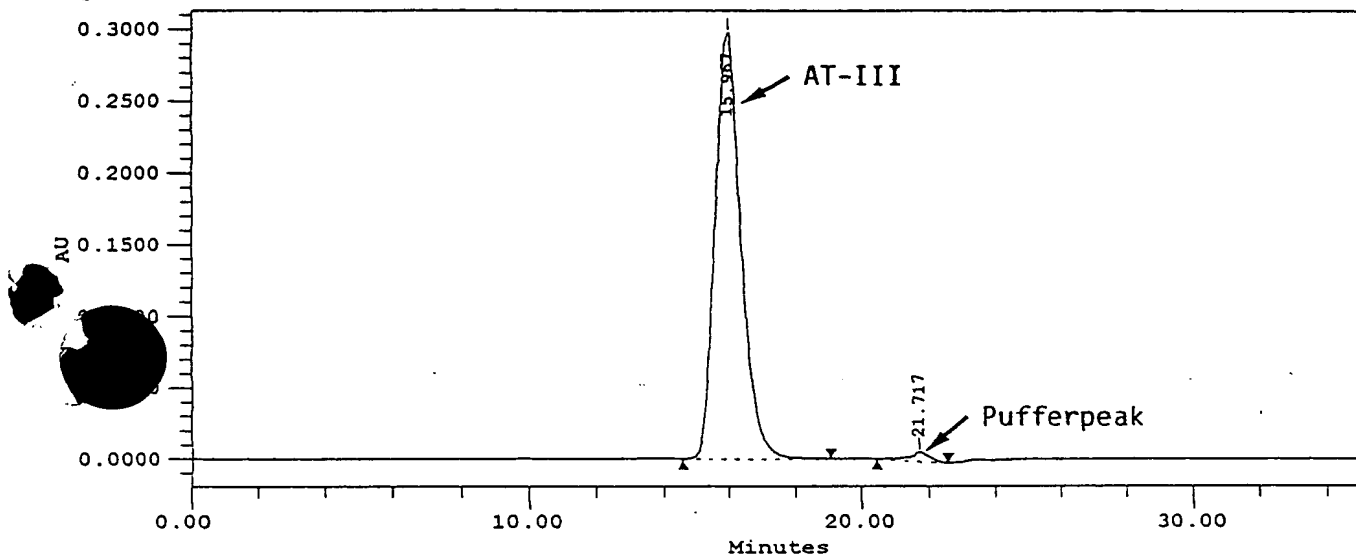
*Ergebnis :*

#	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	% Area	Name
1	9.467	74539	0.18	Polymer
2	14.267	40757727	99.82	Monomer



## Abbildung 6

HPSE-Chromatogramm einer gemäß Beispiel 9  
hergestellten Antithrombin (AT-III) Lösung



Ergebnis :

#	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	% Area	Name
1	15.967	16341442	98.35	
2	21.717	274834	1.65	

## Zusammenfassung

### Verfahren zur chromatographischen Fraktionierung von Plasma oder Serum, so erhaltene Präparate und deren Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Fraktionierung von Plasma oder Serum in mindestens eine Albumin- und eine Immunglobulinfraction durch hydrophobe Interaktionschromatographie mittels eines stufenweisen Salzgradienten, insbesondere mit einem Ammoniumsulfatpuffer, sowie daraus erhaltene Präparate und deren Verwendung.